家蚕 miR-301 对化学感受蛋白基因 *csp*9 表达的调控

杨娟娟, 王远卓, 魏博帆, 邢秋婷, 阚云超, 乔惠丽*

(南阳师范学院, 河南省伏牛山昆虫生物学重点实验室, 昆虫生物反应器河南省工程实验室, 河南南阳 473061)

摘要:【目的】探索家蚕 *Bombyx mori* miRNAs 对化学感受蛋白基因表达的调控作用,以进一步研究 miRNAs 及其靶基因在昆虫化学识别中的作用。【方法】利用生物信息学方法预测和筛选可能作用于家蚕化学感受蛋白 CSPs 基因家族成员的 miRNAs;实时荧光定量 PCR 分析预测获得的候选 miR-301 和其作用的靶基因在家蚕成虫不同组织中的表达变化;构建 miR-301 预测靶基因 3′-UTR 的双荧光素酶报告载体,与合成的 miR-301 mimics 或阴性对照转染人胚肾细胞 HEK293,通过双荧光素酶报告基因检测系统中荧光素酶活性变化检测 miR-301 对其靶基因表达的调控作用。【结果】生物信息学分析结果发现,家蚕化学感受蛋白基因 *csp*9 是 miR-301 的预测靶基因,二者的结合位点位于 *csp*9 的 3′-UTR 区。实时荧光定量 PCR 检测结果表明,miR-301 在交配后家蚕雌雄成虫触角和雄成虫头部都显著上调表达,靶基因 *csp*9 在对应组织中表达则显著下调。二者共转染 HEK293 细胞后,双荧光素酶检测结果表明,miR-301 可以通过与 *csp*9 3′-UTR 的互作,显著抑制上游荧光素酶报告基因的表达。【结论】家蚕化学感受蛋白基因 *csp*9 是 miR-301 的靶基因,miR-301 通过与靶基因3′-UTR的结合,在翻译水平上抑制 *csp*9 的表达。

关键词: 家蚕; miRNA; 化学感受蛋白; 靶基因; 实时荧光定量 PCR; 双荧光素酶

中图分类号: Q966　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2018)10-1145-08

Regulation of the expression of chemosensory protein gene *csp*9 by miR-301 in *Bombyx mori*

YANG Juan-Juan, WANG Yuan-Zhuo, WEI Bo-Fan, XING Qiu-Ting, KAN Yun-Chao, QIAO Hui-Li*

(Henan Provincial Key Laboratory of Insect Biology in Funiu Mountain, Henan Provincial Engineering Laboratory of Insects Bio-reactor, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473061, China)

Abstract:【Aim】To explore the role of miRNAs in regulating the expression of chemosensory protein genes in the silkworm, *Bombyx mori*, so as to further study the functions of miRNAs and their target genes in insect chemoreception.【Methods】The miRNAs that may interact with silkworm CSPs gene family were predicted and screened using bioinformatics methods, and the expression changes of candidate miR-301 and its target gene in different tissues of silkworm adults were analyzed using RT-qPCR. Dual luciferase report vector for miR-301 target gene 3′-UTR was constructed and transfected into human embryonic kidney 293 (HEK293) cells with miR-301 mimics or the negative control. The regulation of expression of the target gene by miR-301 was detected by the change of luciferase activity in dual luciferase reporter gene assay system.【Results】The results of bioinformatics analysis showed that *csp*9, a silkworm chemosensory protein gene, is a predicted target gene of miR-301, and its binding site with miR-301 is located in the 3′-UTR region of *csp*9. RT-qPCR results showed that the expression of miR-301 was significantly up-regulated in male and female adult antennae and male adult head after

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201754); 河南省高等学校青年骨干教师项目(2016GGJS-127); 南阳师范学院 STP 项目(17385)

作者简介: 杨娟娟, 女, 1992 年 7 月生, 河南信阳人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生理生化与分子生物学, E-mail: 2269943729@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: qiaohuili@nynu.edu.cn

收稿日期 Received: 2018-04-02; 接受日期 Accepted: 2018-06-12

mating, while the expression of *csp*9 was significantly down-regulated in these tissues. Dual luciferase assays showed that miR-301 significantly inhibited the expression of luciferase reporter gene by interacting with *csp*9 3′-UTR after co-transfection into HEK293 cells. 【Conclusion】In *B. mori* the chemosensory protein gene *csp*9 is a target gene of miR-301, its expression at the translational level is inhibited by miR-301 through binding to its 3′-UTR.

Key words: *Bombyx mori*; miRNA; chemosensory protein; target gene; RT-qPCR; dual luciferase

microRNAs(miRNAs)是一类内生的、长度约19~22 bp的单链小分子RNA,普遍存在于各种生物中,在细胞内具有多种重要的调节作用(Pasquinelli *et al*., 2000; Reinhart *et al*., 2000; Lagos-Quintana, *et al*., 2001; Kim, 2005)。miRNAs 主要通过与靶基因的 mRNA 的3′或5′非翻译区互补结合,导致靶基因的降解或翻译抑制,从而在转录或翻译水平上调控基因表达(Jiang *et al*., 2013; Yang *et al*., 2014; He *et al*., 2016; Zhang *et al*., 2016)。每个 miRNA 可以有多个靶基因,几个 miRNAs 也可以调节同一个基因。已有报道表明,多达 30% 的基因是 miRNAs 的潜在靶基因(Lewis *et al*., 2005),因而 miRNAs 靶标的检测逐渐成为研究 miRNAs 功能的重要环节。

化学感受蛋白(chemosensory proteins, CSPs)是一类在昆虫中广泛分布的、小分子量的可溶性蛋白,与气味分子结合蛋白(odorant-binding proteins, OBPs)类似,在昆虫感受和识别化学分子的早期阶段发挥至关重要的作用,但 CSPs 的组织表达更广泛,功能更多样。此外,CSPs 在昆虫中的保守性强,不仅同种昆虫不同化学感受蛋白保持较高的同源性,而且不同目、科昆虫之间也有较高的同源性,如沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 和东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 的 CSPs 的同源性为 50% ~60%,直翅目和鳞翅目之间为37% ~50%(Martín-Blázquez *et al*., 2017)。研究表明,CSPs 不仅在昆虫的化学识别中具有运输非挥发性化学分子的作用(Angeli *et al*., 1999; Jacquin-Joly *et al*., 2001; Qiao *et al*., 2013; Li *et al*., 2016; Zhu *et al*., 2016; Cui *et al*., 2017; Wang *et al*., 2017),还具有调节昆虫生长发育、蜕皮和生活型转换等多种生理功能(Nomura *et al*., 1992; Maleszka *et al*., 2007; Guo *et al*., 2011; Cheng *et al*., 2015)。

家蚕 *Bombyx mori* 作为鳞翅目昆虫的模式生物,在研究昆虫变态发育及农林业害虫防治中发挥着重要作用。家蚕 CSPs 的功能也具有多样性,不仅具有化学识别的功能,还可能具有化学识别以外的功能(Qiao *et al*, 2013; 郭兴国等, 2016)。本研究通过生物信息学分析,对家蚕 CSPs 编码基因存在潜在调控位点的 miRNAs 进行了预测,发现在家蚕 *csp*9 的 3′-UTR 区存在一个 miR-301 的调控位点。进一步通过实时荧光定量 PCR 分析 miR-301 和其靶基因 *csp*9 在家蚕不同组织中的表达;构建 *csp*9 基因的野生型和突变型 3′-UTR 双荧光素酶报告载体,与 miR-301 mimics 和阴性对照共转染 HEK293 细胞,通过检测细胞中荧光素酶活性,明确 miR-301 与靶基因 *csp*9 的互作和调控方式,为深入研究 miR-301 在家蚕生长发育过程中的功能提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

家蚕品种 P50 由本实验室保存。自然光照条件下催青,孵化后饲养温度为 25℃,相对湿度为 60% ~70%,自然光周期条件,以新鲜桑叶饲养。

HEK293 细胞,大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 为本实验室保存。DMEM 高糖培养基(Hyclone 公司),胎牛血清(BI 公司),miRNA-301 mimics 及阴性对照(广州锐博生物技术有限公司),X-treme GENE siRNA 转染试剂(Roche 公司),Trizol Reagent (Invitrogen 公司),RevertAid 反转录试剂盒、限制性内切酶 *Not* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ(Fermentas 公司),荧光素酶报告质粒 psiCHECK-2、双荧光素酶报告基因检测系统(Promega 公司),质粒 DNA 小量提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒(Axygen 公司),DL2000 DNA Ladder、ExTaq 酶、DNA 连接试剂盒(TaKaRa 公司)。

1.2 家蚕 miRNAs 靶基因的预测

根据家蚕基因组数据库(http://silkworm.genomics.org.cn)和 NCBI 数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)中已知的所有编码 CSPs 基因的序列和来自 miRBase 数据库(http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl)的家蚕 miRNAs 的序列信息,利用靶基因预测软件 RNAhybrid 和 TargetScanFish 预测可能调控家蚕 CSPs 家族编码基因表达的

miRNAs,及其与 CSP 靶基因的结合位点。根据成熟 miRNA 5′端 2－8 位碱基序列配对情况及其与靶基因互作位点的结合自由能,筛选 miRNAs 的候选靶基因用于后续验证实验。

1.3　家蚕组织总 RNA 提取

取家蚕羽化后 24 h 雌雄成虫至少 5 头个体的触角、头、翅、足、胸、腹和生殖腺组织样品,迅速置于无 RNA 酶的离心管中,液氮速冻后保存于－80℃冰箱保存备用。按照 Trizol 试剂(Invitrogen)说明书提取家蚕样品总 RNA。

1.4　家蚕 miR-301 的克隆及序列鉴定

以家蚕触角总 RNA 为模板,根据 Genecopoeia 的 All-in-one miRNA RT-qPCR 检测试剂盒,通过添加 oligo dT 接头合成 cDNA 第 1 链,然后利用成熟 miR-301 上游序列引物(5′-TTCGTTGTCGTCGAAACCTGCAA-3′)和下游接头通用引物(Genecopia,P01011A)进行 PCR,反应条件:95℃预变性 5 min;95℃变性 15 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s,共 30 个循环; 72℃终延伸 10 min。PCR 产物经切胶回收后连接到 pMD-19T 克隆载体。连接产物转化 DH10B 大肠杆菌感受态细胞,挑单菌落培养后经菌液 PCR 检测后送北京华大基因科技有限公司测序验证。

1.5　RT-qPCR 检测家蚕 miR-301 和靶基因 *csp*9 的表达

以 1.3 节提取家蚕成虫不同组织 RNA 为模板,同 1.4 节利用 Genecopoeia 的 All-in-one miRNA RT-qPCR 检测试剂盒,对家蚕 miR-301 进行 RT-qPCR 分析,检测其在家蚕成虫不同组织中的表达量。以 1.3 节提取家蚕成虫不同组织 RNA 为模板,根据 Fermentas 的 RevertAid 反转录试剂盒说明书合成 cDNA 第 1 链,利用 miR-301 靶基因 *csp*9(GenBank 登录号: NM_001043604)的特异引物(csp9-F: 5′-CAGGACATCAACGCAATGAT-3′; csp9-R: 5′-TCACCTCCGGAATCTATTAAG-3′)进行 RT-qPCR 分析,分析 miR-301 靶基因的表达。实验均设 3 个生物学重复及 3 次技术重复,家蚕 5S rRNA (GenBank 登录号: M35394.1)为 miRNA 表达分析的内参基因,引物序列 5SrRNA-F: 5′-CGTCCGATCACCGAAGTCAAG-3′; 5SrRNA-R: 5′-AGGCGGTCACCCATCCAAGTA-3′。家蚕肌动蛋白基因 *actinA*3(GenBank 登录号: U49854)为靶基因表达分析的内参基因,引物序列 actinA3-F: 5′-ATGTGCGACGAAGAAGTTGC-3′; actinA3-R: 5′-GTCTCCTACGTACGAGTCCT-3′。反应条件: 95℃预变性 5 min; 95℃变性 15 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s,共 40 次循环;72℃终延伸 10 min,溶解曲线在 65℃～95℃之间。扩增结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$法进行数据分析。引物由北京华大基因科技有限公司合成。

1.6　miRNA mimics 的合成

根据 miRNA-301 的成熟序列,及其与靶基因的互作位点,由英骏生物技术有限公司分别合成野生型 miR-301 mimics 及阴性对照 miR-301 mimics-NC。二者的序列分别为: miR-301 mimics: UUCGUUGUCGUCGAAACCUGCAA; miR-301 mimics-NC: AAGUCCGAACGUGUCACGUTT。

1.7　miR-301 靶基因 3′-UTR 野生型和突变型双荧光素酶报告载体构建

以 1.5 节 RevertAid 反转录试剂盒合成的家蚕触角 cDNA 为模板,以野生型 miR-301 靶基因 3′-UTR 的上下游特异引物扩增 196 bp 的目的片段, PCR 产物经切胶回收后连接到 pMD-19T 克隆载体经转化、菌液 PCR 和双酶切检测后送北京华大基因科技有限公司测序验证。互作位点由 5′-ACGACAACGAA-3′整体突变为 5′-TGCTGTTGCTT-3′后的突变型 *csp*9 3′-UTR 全长序列由英骏生物科技有限公司合成并连接于 pMD-19T 载体上。测序正确的野生型和突变型质粒经限制性内切酶 *Xho* Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 双酶切,酶切产物纯化后用 T4 DNA 连接酶连接到双荧光素酶报告载体 psiCheck2 中 *Renilla* 荧光报告基因的下游,转化后提取质粒,经双酶切和测序鉴定后的野生型和突变型质粒载体分别命名为 *csp*9 3′-UTR-W/psiCheck2 和 *csp*9 3′-UTR-M/psiCheck2。*csp*9 3′-UTR-W/psiCheck2 载体构建的引物序列 3′-UTR-*Xho*I-F: 5′-AG<u>*CTCGAG*</u>CGGAGAGCTAATGGTGGACA-3′; 3′-UTR-*Not*I-R: 5′-AT<u>*GCGGCCGC*</u>CGACGGTCGCAACGTGAAC-3′(下划线示酶切位点)。

1.8　细胞培养及转染

用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,于 37℃,5% CO_2 的培养条件下培养 HEK293 细胞,细胞铺满培养瓶底部 80% 时可传代培养,对数生长期细胞经胰蛋白酶消化,PBS 洗涤后,调整细胞密度至 1×10^6 个/mL 用于转染实验。瞬时转染按照 Roche X-tremeGENE siRNA 转染试剂说明书进行,转染前 1 d 接种细胞于 24 孔板中,使转染时细胞密度为 30%～50%。实验分 5 组:分别为 *csp*9 3′-UTR-W/psiCheck2(野生型), *csp*9 3′-UTR-W/psiCheck2(野

生型）+ miR-301 mimics，*csp*9 3′-UTR-W/psiCheck2（野生型）+ miR-301 mimics-NC，*csp*9 3′-UTR-M/psiCheck2（突变型），*csp*9 3′-UTR-M/psiCheck2（突变型）+ miR-301 mimics，每组设 3 个平行孔，实验重复 3 次。转染后 48 h 裂解细胞，检测荧光素酶活性。

1.9 荧光素酶活性测定

根据 Promega 公司的双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书，去除 24 孔细胞板中的培养基，用 PBS 清洗细胞，每孔加入 100 μL 1 × PLB 裂解液，室温轻缓晃动培养板 15 min，然后转移 20 μL 裂解液到加有 100 μL LARII 的检测管中，混匀后利用荧光发光仪检测内参 Firefly 荧光素酶活性（F），每孔再加入 100 μL 1 × Stop&Glo ® 试剂，快速混匀后检测报告基因 Renilla 荧光素酶活性（R），通过对每组样品的 R/F 比值进行均一化后作为纵坐标进行作图分析。Renilla 荧光素酶编码基因位于待检测靶基因 *csp*9 3′-UTR 的上游，miR-301 可通过与野生型载体上 3′-UTR 区的互作来改变 Renilla 荧光素酶活性，而突变型载体上二者的互作位点已改变，Renilla 荧光素酶活性理论上不发生变化。从而通过比较 miR-301 与靶基因 3′-UTR 野生型或突变型双荧光素酶报告载体转染后 R/F 的变化，判断 miR-301 通过与靶基因 3′-UTR 互作对靶基因的调控作用。

1.10 数据分析

实验数据利用 Prism 5 软件进行绘图和统计分析，数据分析采用单因素方差分析和 Tukey 氏检验。并通过 Microsoft Powerpoint 对图片进行整合处理。

2 结果

2.1 家蚕 miRNA 靶基因的预测

采用 RNAhybrid 和 TargetScanFish 软件将 miRBase 数据库中家蚕成熟 miRNAs 序列与家蚕基因组和 NCBI 数据库中编码 CSPs 的全基因序列进行比对，其中 miR-301 的第 2 – 8 位种子区碱基与 *csp*9 的 3′-UTR 存在互补配对（图 1），推测家蚕化学感受蛋白基因 *csp*9 可能是 miR-301 的潜在靶基因。

```
csp9 3′-UTR
      5′ A   A  C      A            G 3′
            UG  AG      C  ACGACAACGAA
            AC  UC      G  UGCUGUUGCUU
      3′ A   G   CAAA  C              5′
miR-301
```

图 1 miR-301 在靶基因 *csp*9 3′-UTR 上的结合位点预测
Fig. 1 Predicted binding site of miR-301 in 3′-UTR of *csp*9

2.2 家蚕 miR-301 的克隆及序列鉴定

课题组在前期对家蚕 CSPs 家族编码基因研究基础上，发现作为 miR-301 预测的靶基因 *csp*9 在成虫触角和头部具有相对较高的表达量（Qiao *et al*., 2013），推测 miR-301 可能与 *csp*9 共表达于家蚕相同组织中，因而首先以家蚕触角来源的 cDNA 第 1 链为模板，通过 PCR 扩增 miR-301 及其 3′接头片段，大小约为 100 bp，扩增产物电泳检测结果如图 2 所示，目的片段分子量大小与理论一致。连接 pMD-19T 克隆载体后，挑阳性菌落经 PCR 鉴定后进行测序，测序结果表明扩增出的家蚕 miR-301 序列与其成熟 miRNA 序列完全一致。

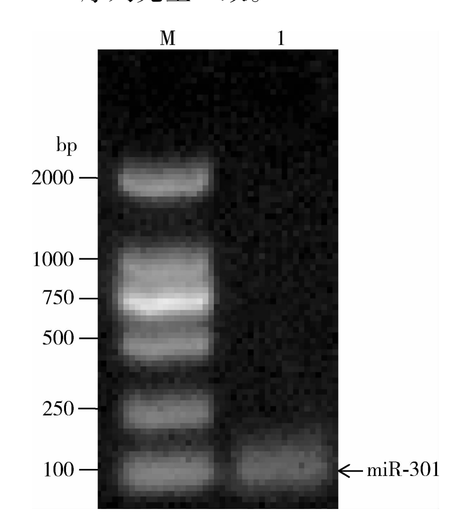


图 2 家蚕 miR-301 的 PCR 鉴定
Fig. 2 Identification of *Bombyx mori* miR-301 by PCR
M：DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker；1：miR-301 PCR 产物 PCR product of miR-301.

2.3 miR-301 及其靶基因 *csp9* 在家蚕不同组织中的表达分析

利用 RT-qPCR 的方法，首先分析了 miR-301 及其预测靶基因 *csp*9 在家蚕羽化后 24 h 雌雄成虫不同组织中的相对表达水平。结果表明，miR-301 在雌雄成虫触角、头部和精巢中表达量较高，其他组织中表达量极少或无表达；相反，*csp*9 不仅在触角和头部有表达，在除精巢和卵巢之外的其他组织中也均有表达（图 3）。

由于 miR-301 在家蚕成虫触角和头部具有较高的表达量，而 CSPs 蛋白的主要功能之一是参与化学信息识别，因而进一步分析了 miR-301 及其预测靶基因 *csp*9 在家蚕羽化后 24 h 交配前后成虫触角和头部的相对表达水平。结果显示，miR-301 在交配后的雌成虫触角、雄成虫触角和头部中的表达量显

著高于未交配的成虫组织，而在交配前后的雌成虫头部中表达无差异；*csp*9 在交配前后的雌性成虫触角、雄性成虫触角和头部中的表达趋势与 miR-301 正好相反，交配前后的雌成虫头部同样无表达差异（图 4）。

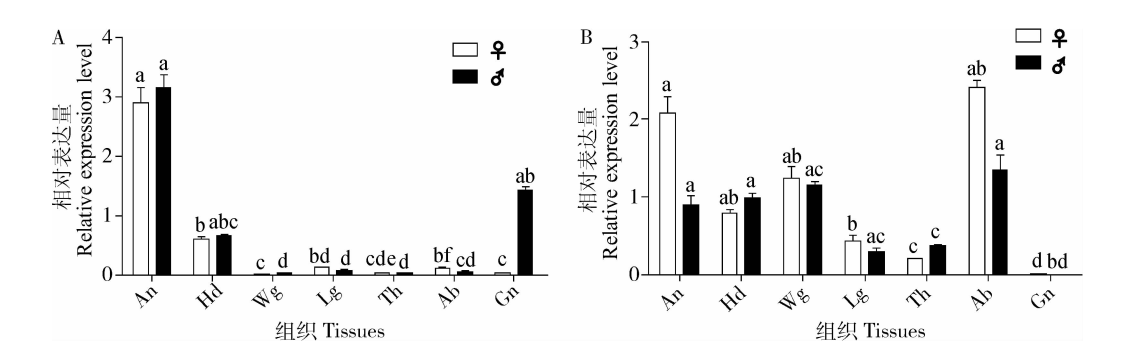


图 3　RT-qPCR 检测 miR-301（A）及其预测靶基因 *csp*9（B）在家蚕成虫不同组织中的表达

Fig. 3　Expression analysis of miR-301 (A) and its predicted target gene *csp*9 (B) in different tissues of *Bombyx mori* adults by RT-qPCR

An：触角 Antenna；Hd：头 Head；Wg：翅 Wing；Lg：足 Leg；Th：胸 Thorax；Ab：腹 Abdomen；Gn：生殖腺 Genitalia. 图中数据为平均值 ± 标准误，柱上不同小写字母示差异显著（$P<0.05$）（单因素方差分析，Tukey 氏检验）。Data in the figure are mean ± *SE*. Different lowercase letters above bars indicate significant difference ($P<0.05$) (one-way ANOVA, Tukey's test).

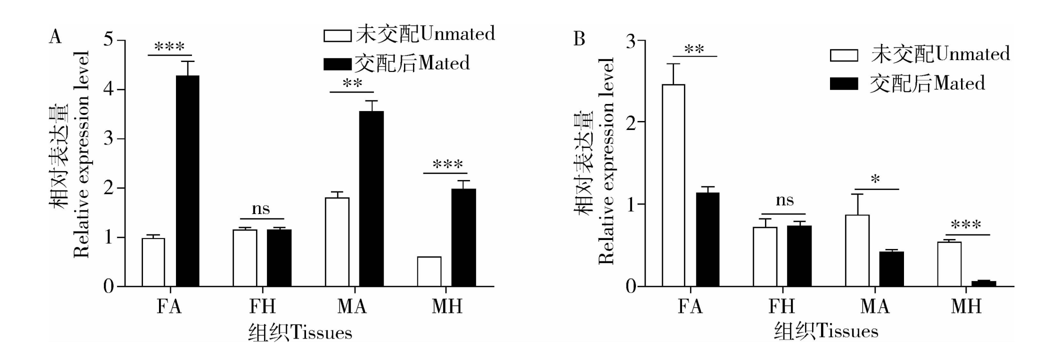


图 4　RT-qPCR 检测 miR-301（A）及其预测靶基因 *csp*9（B）在家蚕成虫交配前后触角和头部中的表达

Fig. 4　Expression analysis of miR-301 (A) and its predicted target gene *csp*9 (B) in the antenna and head of unmated and mated adults of *Bombyx mori* by RT-qPCR

FA：雌性触角 Female antenna；FH：雌性头部 Female head；MA：雄性触角 Male antenna；MH：雄性头部 Male head. 图中数据为平均值 ± 标准误（单因素方差分析，Tukey 检验）。Data in the figure are mean ± *SE*, and were analyzed by one-way ANOVA, Tukey's test. $^{***}P<0.001$；$^{**}P<0.01$；$^{*}P<0.05$；^{ns}无显著差异 No significant difference.

2.4　野生型和突变型 *csp*9 3′-UTR 双荧光素酶报告载体构建

以 oligo dT 反转录后家蚕 cDNA 为模板，通过 PCR 扩增 *csp*9 3′-UTR 序列，结果如图 5（A）所示，目的条带与理论片段大小一致（196 bp）。野生型和突变型 *csp*9 3′-UTR 连接到 psiCheck2 载体后，经 *Xho* Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 双酶切鉴定，二者酶切片段大小与预期一致（图 5：B），测序结果显示野生型和突变型双荧光素酶报告载体的序列与理论一致，表明 *csp*9 3′-UTR-W/psiCheck2（野生型）和 *csp*9 3′-UTR-M/psiCheck2（突变型）双荧光素酶报告载体构建成功。

2.5　荧光素酶活性分析

利用双荧光素酶报告基因检测试剂盒测定野生型或突变型重组双荧光素酶质粒与 miR-301 mimics 或阴性对照转染 HEK293 细胞后的荧光素酶活性，并用 Renilla 荧光素酶活性与 Firefly 荧光素酶活性的比值（R/F）对数据进行校正。结果如图 6 所示，仅当野生型 *csp*9 3′-UTR-W/psiCheck2 与 miR-301 mimics 共转时，报告基因表达产物的荧光素酶活性低于野生型 *csp*9 3′-UTR-W/psiCheck2 和突变型 *csp*9 3′-UTR-M/psiCheck2 空载对照质粒及阴性对照转染组：野生型 *csp*9 3′-UTR-W/psiCheck2 与 miR-301 mimics-NC，突变型 *csp*9 3′-UTR-M/psiCheck2

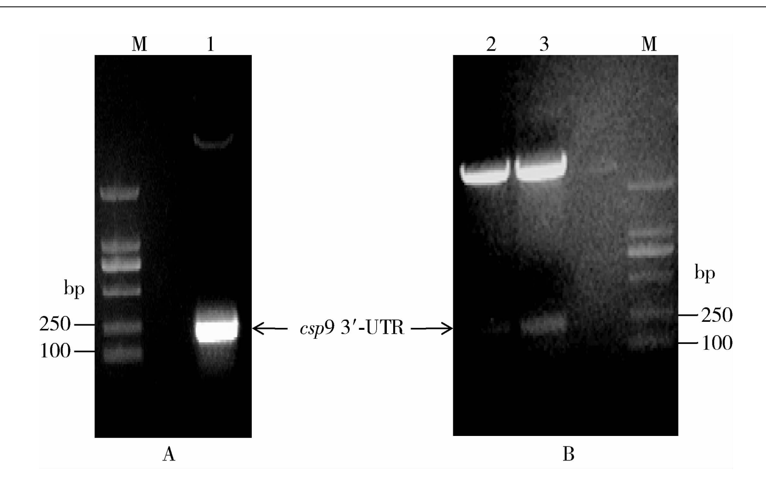


图 5 野生型和突变型 *csp*9 3′-UTR 双荧光素酶报告载体的鉴定

Fig. 5 Identification of dual luciferase report vector of the wild type and mutant *csp*9 3′-UTR

A: *csp*9 3′-UTR PCR 扩增结果 PCR product of *csp*9 3′-UTR; B: *csp*9 3′-UTR/psiCheck2 重组质粒双酶切鉴定 Double enzyme identification of *csp*9 3′-UTR/ psiCheck2; M: DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker; 1: *csp*9 3′-UTR PCR 扩增结果 PCR product of *csp*9 3′-UTR; 2: 突变型 *csp*9 3′-UTR-M/psiCheck2 双酶切鉴定 Double enzyme identification of mutant *csp*9 3′-UTR-M/psiCheck2; 3: 野生型 *csp*9 3′-UTR-W/psiCheck2 双酶切鉴定 Double enzyme identification of wild type *csp*9 3′-UTR-W/psiCheck2.

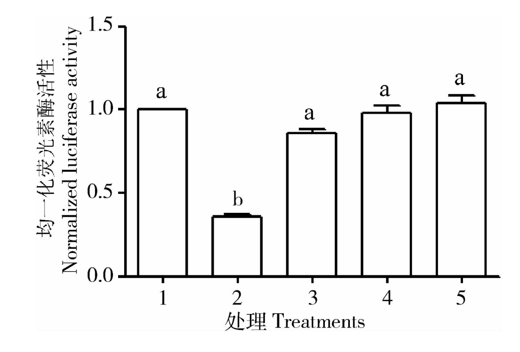


图 6 野生型或突变型重组 *csp*9 3′-UTR 质粒与 miR-301 mimics 转染 HEK293 细胞后荧光素酶活性分析

Fig. 6 Analysis of luciferase activity in HEK293 cells after transfected with wild type or mutant *csp*9 3′-UTR plasmid and miR-301 miRNA mimics

1: 野生型 *csp*9 3′-UTR-W/psiCheck2 空载对照 Wild type *csp*9 3′-UTR-W/psiCheck2 vector control; 2: 野生型 *csp*9 3′-UTR-W/ psiCheck2 + miR-301 mimics (Wild type *csp*9 3′-UTR-W/psiCheck2 + miR-301 mimics); 3: 野生型 *csp*9 3′-UTR-W/psiCheck2 + miR-301 mimics 阴性对照 Wild type *csp*9 3′-UTR-W/psiCheck2 + miR-301 mimics-NC; 4: 突变型 *csp*9 3′-UTR-M/psiCheck2 空载对照 Mutant *csp*9 3′-UTR-M/psiCheck vector control; 5: 突变型 *csp*9 3′-UTR-M/ psiCheck2 + miR-301 mimics (Mutant *csp*9 3′-UTR-M/psiCheck2 + miR-301 mimics). 图中数据为平均值 ± 标准误,柱上不同小写字母示差异显著($P < 0.05$)(单因素方差分析,Tukey 氏检验)。Data in the figure are mean ± *SE*. Different lowercase letters above bars indicate significant difference ($P < 0.05$) (one-way ANOVA, Tukey's test).

与 miR-301 mimics。利用单因素方差分析进行统计学分析,结果表明,实验组与对照组之间的差异达到显著水平($P < 0.05$),由此表明 miR-301 可以在细胞水平通过与靶基因 3′-UTR 的互作抑制其在翻译水平的表达,且差异显著。

3 讨论

近年来,随着对 miRNA 的大量研究表明,miRNA 在基因转录后和翻译后的调控中发挥越来越重要的作用。在家蚕中已经发现大量 miRNA(He *et al*., 2008; Liu *et al*., 2010; Huang *et al*., 2010; Wu *et al*., 2016; Qin *et al*., 2018),miRBase 数据库中登录的家蚕各个发育时期的 miRNA 已经高达 563 条。已有研究表明,家蚕 miRNA 具有时空表达特异性(Yu *et al*., 2008; Zhang *et al*., 2009; Li *et al*., 2014),miRNA 通过调控基因表达在家蚕生长发育的过程中具有重要作用(Jiang *et al*., 2013; Ling *et al*., 2014, 2015; Wang *et al*., 2016; Qian *et al*., 2018; Liu *et al*., 2018)。此外家蚕 CSPs 的功能具有多样性,且大部分家蚕 CSPs 在 mRNA 水平和蛋白水平的表达存在不一致,能在蛋白水平上检测到的 CSPs 数量非常有限,从而提示我们在家蚕中是否存在 CSPs 的调控因子,通过在转录和翻译水平上调控 CSPs 的表达来影响其功能。

本研究利用生物信息学技术,筛选出一个在家蚕化学感受蛋白 CSP9 编码基因的 3′-UTR 区具有潜在结合位点的 miR-301,预测 *csp*9 可能是 miR-301 的靶基因。RT-qPCR 表明,二者在家蚕成虫交配前后不同组织的表达具有相互抑制作用,且差异显著。进一步通过构建 *csp*9 3′-UTR 的野生型和突变型双

荧光素酶重组报告载体，与 miR-301 mimics 和阴性对照共转染 HEK293 细胞，结果表明，miR-301 可以特异性作用于 CSP9 基因的 3′-UTR，从而使其上游荧光素酶报告基因的表达显著下调，同时表明 miR-301 与 CSP9 具有靶向关系。

昆虫 CSPs 保守性强，功能多样。CSPs 不仅能结合并运输非挥发性的化学分子，在甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* 中发现，CSPA6 能结合挥发性的性信息素分子顺 11-十六烯基乙酸酯（*Z*11-16：Ac）和顺 11-十八烯基乙酸酯（*Z*11-18：Ac）（Jacquin-Joly *et al*., 2001），在性信息素的传递过程中发挥作用。本研究通过对 miR-301 与 *csp*9 在家蚕交配前后触角感受器官触角和头部的表达分析及二者相互作用调控的研究，推测 miR-301 可能通过与 *csp*9 的互作调控家蚕性信息素分子的识别和传递。研究结果为家蚕 CSPs 功能研究中新的调控模式提供了新的证据和思路，同时也为其他昆虫是否存在类似的调控模式提供了借鉴。此外，由于体外细胞实验与家蚕个体基因的表达调控仍存在一定的差异，因此，家蚕 miR-301 对 *csp*9 的调控作用还需进一步在个体水平进行验证。

参考文献（References）

Angeli S, Ceron F, Scaloni A, Monti M, Monteforti G, Minnocci A, Petacchi R, Pelosi P, 1999. Purification, structural characterization, cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*. *Eur. J. Biochem*., 262(3): 745–754.

Cheng D, Lu Y, Zeng L, Liang G, He X, 2015. *Si-CSP*9 regulates the integument and moulting process of larvae in the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. *Sci. Rep*., 5: 9245.

Cui L, Rui C, Yang D, Wang Z, Yuan H, 2017. *De novo* transcriptome and expression profile analyses of the Asian corn borer (*Ostrinia furnacalis*) reveals relevant flubendiamide response genes. *BMC Genomics*, 18(1): 20.

Guo W, Wang X, Ma Z, Xue L, Han J, Yu D, Kang L, 2011. CSP and takeout genes modulate the switch between attraction and repulsion during behavioral phase change in the migratory locust. *PLoS Genet*., 7(2): e1001291.

Guo XG, Chen Y, Xing QT, Xing WJ, Kan YC, Qiao HL, 2016. Expression and binding characterization of chemosensory protein CSP16 in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin*., 59(6): 613–621. [郭兴国，陈莹，邢秋婷，邢万静，阚云超，乔惠丽，2016. 家蚕化学感受蛋白 CSP16 的表达及结合特性分析. 昆虫学报，59(6): 613–621]

He J, Chen Q, Wei Y, Jiang F, Yang M, Hao S, Guo X, Chen D, Kang L, 2016. MicroRNA-276 promotes egg-hatching synchrony by up-regulating *brm* in locusts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113(3): 584–589.

He PA, Nie Z, Chen J, Chen J, Lv Z, Sheng Q, Zhou S, Gao X, Kong L, Wu X, Jin Y, Zhang Y, 2008. Identification and characteristics of microRNAs from *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 9: 248.

Huang Y, Zou Q, Tang SM, Wang LG, Shen XJ, 2010. Computational identification and characteristics of novel microRNAs from the silkworm (*Bombyx mori* L.). *Mol. Biol. Rep*., 37(7): 3171–3176.

Jacquin-Joly E, Vogt RG, Francois MC, Francois MC, Nagnan-Le MP, 2001. Functional and expression pattern analysis of chemosensory proteins expressed in antennae and pheromonal gland of *Mamestra brassicae*. *Chem. Senses*, 26(7): 833–844.

Jiang J, Ge X, Li Z, Wang Y, Song Q, Stanley DW, Tan A, Huang Y, 2013. MicroRNA-281 regulates the expression of ecdysone receptor (EcR) isoform B in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 43(8): 692–700.

Kim VN, 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*., 6(5): 376–385.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T, 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543): 853–858.

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP, 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120(1): 15–20.

Li HL, Ni CX, Tan J, Zhang LY, Hu FL, 2016. Chemosensory proteins of the eastern honeybee, *Apis cerana*: identification, tissue distribution and olfactory related functional characterization. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol*., 194–195: 11–19.

Li J, Cai Y, Ye L, Wang S, Che J, You Z, Yu J, Zhong B, 2014. MicroRNA expression profiling of the fifth-instar posterior silk gland of *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 15: 410.

Ling L, Ge X, Li Z, Zeng B, Xu J, Aslam AF, Song Q, Shang P, Huang Y, Tan A, 2014. MicroRNA *Let*-7 regulates molting and metamorphosis in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 53: 13–21.

Ling L, Ge X, Li Z, Zeng B, Xu J, Chen X, Shang P, James AA, Huang Y, Tan A, 2015. MiR-2 family targets *awd* and *fng* to regulate wing morphogenesis in *Bombyx mori*. *RNA Biol*., 12(7): 742–748.

Liu S, Li D, Li Q, Zhao P, Xiang Z, Xia Q, 2010. MicroRNAs of *Bombyx mori* identified by Solexa sequencing. *BMC Genomics*, 11: 148.

Liu Z, Ling L, Xu J, Zeng B, Huang Y, Shang P, Tan A, 2018. MicroRNA-14 regulates larval development time in *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 93: 57–65.

Maleszka J, Forêt S, Saint R, Maleszka R, 2007. RNAi-induced phenotypes suggest a novel role for a chemosensory protein CSP5 in the development of embryonic integument in the honeybee (*Apis mellifera*). *Dev. Genes Evol*., 217(3): 189–196.

Martín-Blázquez R, Chen B, Kang L, Bakkali M, 2017. Evolution, expression and association of the chemosensory protein genes with

the outbreak phase of the two main pest locusts. *Sci. Rep.*, 7(1): 6653.

Nomura A, Kawasaki K, Kubo T, Natori S, 1992. Purification and localization of p10, a novel protein that increases in nymphal regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach). *Int. J. Dev. Biol.*, 36(3): 391-398.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G, 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of *let*-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408(6808): 86-89.

Qian P, Jiang T, Wang X, Song F, Chen C, Shen X, 2018. bmo-miR-275 down-regulates expression of *Bombyx mori* sericin gene 2 *in vitro*. *PLoS ONE*, 13(1): e0190464.

Qiao HL, Deng PY, Li DD, Chen M, Jiao ZJ, Liu ZC, Zhang YZ, Kan YC, 2013. Expression analysis and binding experiments of chemosensory proteins indicate multiple roles in *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 59(7): 667-675.

Qin S, Danso B, Zhang J, Li J, Liu N, Sun X, Hou C, Luo H, Chen K, Zhang G, Li M, 2018. MicroRNA profile of silk gland reveals different silk yields of three silkworm strains. *Gene*, 653: 1-9.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G, 2000. The 21-nucleotide *let*-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772): 901-906.

Wang R, Li F, Zhang W, Zhang X, Qu C, Tetreau G, Sun L, Luo C, Zhou J, 2017. Identification and expression profile analysis of odorant binding protein and chemosensory protein genes in *Bemisia tabaci* MED by head transcriptome. *PLoS ONE*, 12(2): e0171739.

Wang X, Tang S, Song F, Chen C, Guo X, Shen X, 2016. Bmo-mir-2758 targets *BmFMBP*-1 (Lepidoptera: Bombycidae) and suppresses its expression in BmN cells. *J. Insect Sci.*, 16(1): 28.

Wu P, Jiang X, Guo X, Li L, Chen T, 2016. Genome-wide analysis of differentially expressed microRNA in *Bombyx mori* infected with nucleopolyhedrosis virus. *PLoS ONE*, 11(11): e0165865.

Yang M, Wei Y, Jiang F, Wang Y, Guo X, He J, Kang L, 2014. MicroRNA-133 inhibits behavioral aggregation by controlling dopamine synthesis in locusts. *PLoS Genet.*, 10(2): e1004206.

Yu X, Zhou Q, Li SC, Luo Q, Cai Y, Lin WC, Chen H, Yang Y, Hu S, Yu J, 2008. The silkworm (*Bombyx mori*) microRNAs and their expressions in multiple developmental stages. *PLoS ONE*, 3(8): e2997.

Zhang Y, Zhou X, Ge X, Jiang J, Li M, Jia S, Yang X, Kan Y, Miao X, Zhao G, Li F, Huang YP, 2009. Insect-specific microRNA involved in the development of the silkworm *Bombyx mori*. *PLoS ONE*, 4(3): e4677.

Zhang Z, Tian H, Miao Y, Feng X, Li Y, Wang H, Song X, 2016. Upregulation of p72 enhances malignant migration and invasion of glioma cells by repressing beclin1 expression. *Biochemistry*, 81(6): 574-582.

Zhu J, Iovinella I, Dani FR, Liu YL, Huang LQ, Liu Y, Wang CZ, Pelosi P, Wang G, 2016. Conserved chemosensory proteins in the proboscis and eyes of Lepidoptera. *Int. J. Biol. Sci.*, 12(11): 1394-1404.

(责任编辑：马丽萍)